

Aus dem Institut für  
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Beurteilung der koproskopischen und serologischen  
Methoden zur Diagnose der Rinderfasciolose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Hans Grelck**  
Tierarzt aus Barmstedt  
Berlin 1976

Journal Nr. 872



Aus dem Institut für  
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Beurteilung der koproskopischen und serologischen Methoden zur Diagnose der Rinderfasciolose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Hans Grellck**  
Tierarzt aus Barmstedt  
Berlin 1976

Journal Nr. 872

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches  
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H. Loppnow

Referent: Prof. Dr. F. Hörchner

Korreferent: Prof. Dr. M. Mülling



Tag der Promotion: 22.3.1976

## Inhaltsverzeichnis

|        |                                                                                                            |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Einleitung                                                                                                 | 2  |
| 2.     | Diagnostische Nachweisverfahren bei der Fasciolose des Rindes (an Hand der Literatur)                      | 3  |
| 2.1.   | Koproskopische Nachweisverfahren                                                                           | 3  |
| 2.2.   | Serologische und allergische Nachweisverfahren                                                             | 7  |
| 3.     | Eigene Untersuchungen                                                                                      | 19 |
| 3.1.   | Material und Methodik                                                                                      | 19 |
| 3.2.   | Ergebnisse                                                                                                 | 26 |
| 3.2.1. | Sicherheit der koproskopischen Diagnose bei der Fasciolose des Rindes und Eiausscheidung nach der Therapie | 26 |
| 3.2.2. | Sicherheit der serologischen Diagnose bei der Fasciolose des Rindes und Serumtiterabfall nach der Therapie | 30 |
| 4.     | Besprechung der Ergebnisse                                                                                 | 37 |
| 5.     | Zusammenfassung und Summary                                                                                | 42 |
| 6.     | Literaturverzeichnis                                                                                       | 45 |
|        | Lebenslauf                                                                                                 |    |

## 1. Einleitung

Eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz großflächiger Leberegel-Bekämpfungsmaßnahmen ist eine genaue und im Masseneinsatz anwendbare Diagnose.

Bei der Fasciolose der Wiederkäuer, insbesondere beim Rind, wird seit langem versucht, eine sichere Erfassung der Leberegelträger zu erreichen.

Zwar werden in praxi eine Reihe koproskopischer, teilweise auch serologischer Methoden angewandt, trotzdem gelingt es nicht immer, Rinder eindeutig als Fasciola-negativ oder -positiv zu definieren.

Immunbiologische Nachweismethoden wären der herkömmlichen Kotuntersuchung sichtlich überlegen, vor allem wegen der möglichen Nachweisbarkeit der Parasiten in der bekannten verzögerten Präpatenzzeit, in der die Leberegel bereits ihre volle Pathogenität entfaltet haben, bevor therapeutische Maßnahmen getroffen werden können. Auf der anderen Seite können Rinder während einer Fasciola-Infektion Antikörper bilden, die auch nach der Deparasitierung über mehrere Monate im Organismus verweilen (BENEX und Mitarb., 1973) und so zu falsch positiven Ergebnissen führen. Mit den koproskopischen Nachweisverfahren werden ebenfalls Fehldiagnosen verursacht, wenn Tiere, die keine lebenden Fasciolen mehr beherbergen, über längere Zeit Eiausscheider bleiben (SIX, 1968 b).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche der für den Masseneinsatz brauchbaren Nachweismethoden bei der Fasciolose des Rindes eine Erkennung von Parasiten-trägern garantieren.

## 2. Diagnostische Nachweisverfahren bei der Fasciolose des Rindes (an Hand der Literatur)

### 2.1. Koproskopische Nachweisverfahren

Eine Vielzahl von Techniken zur koproskopischen Diagnostik der chronischen Fasciolose ist bisher beschrieben und angewandt worden. Eines der bedeutsamsten Probleme ist es, eine maximale Konzentration von Eiern bei höchstmöglicher Befreiung von pflanzlichen und mineralischen Bestandteilen zu erreichen. Weiter besteht die Forderung nach einer relativ exakten Methode, die einfach und schnell auszuführen ist.

Die zwei wichtigsten Grundmethoden sind das Flotations- und Sedimentationsverfahren.

WHITLOCK (1950) beschreibt eine Flotationsmethode mit Kalium-Quecksilberjodid als Medium zum quantitativen Nachweis von Trematodeneiern. TEUSCHER (1957) arbeitet mit einer Flotationsflüssigkeit aus Zucker und Zinksulfat mit dem spezifischen Gewicht 1,34. Die Vorteile der Methode bestehen in Einfachheit und Zuverlässigkeit der Befunde beim Schaf. Die Technik muß jedoch in bezug auf die Zeitaufwendigkeit kritisch beurteilt werden, da in den meisten Fällen die Untersuchung mindestens zweier Präparate notwendig ist.

BREZA (1968) hat eine Flotations-Sedimentationsmethode entwickelt, die auf der Flotation von Helmintheneiern in einer gesättigten Natrium-Thiosulfatlösung (spez. Gewicht 1,4) beruht. Ein Übersichten mit Wasser soll ein Anhaften der Leberegelier an der Reagenzglaswand verhindern.

Durch abschließende Sedimentation in Wasser werden Eiermißbildungen verhindert. Die Effizienz wurde an negativen Schaf- und Rinderkotproben (1 bzw. 3 g), denen 6 - 10 Eier zugesetzt wurden, beurteilt. Jeweils die Hälfte der Eimenge konnte in den einzelnen Proben wiedergefunden werden. Nach BREZA (1968) ist diese Methode anderen Verfahren, die miteinander verglichen wurden, weit überlegen und kann auch zur Diagnostik der Dicrocoeliose benutzt werden.

SEWELL und HAMMOND (1972) konnten mit der Flotationsmethode einen durchschnittlichen Erfassungsgrad von 82 % erreichen. Zur Gewinnung der *F. hepatica* Eier benutzten sie einen Zellulosestreifen, der nach dem Zentrifugieren der Kotsuspension in gesättigter  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung auf dem Reagenzglas befestigt wurde. Die Eier waren somit leicht auszuzählen. Leider gehen die Autoren nicht auf die Frage ein, ob diese Methode auch eine genügende Sicherheit bei Tieren mit schwachen Infektionen bietet.

HAGENS (1964) hält das Flotationsverfahren zwar für genauer als die Sedimentation, jedoch kann es bei der  $\text{ZnSO}_4$ -Methode zu Eideformierungen kommen und die mikroskopische Untersuchung erschweren.

HAPPICH und BORAY (1969) überprüften die Genauigkeit der Flotationsmethode nach WHITLOCK (1950) und der Sedimentationstechnik nach BORAY und PEARSON (1960). Nach ihren Ergebnissen war das letztere Verfahren eindeutig der Flotationstechnik überlegen, die nur bei einem Gehalt von 1000 Eiern pro Gramm Kot (epg) und mehr angewandt werden sollte. Bei geringgradigen Infektionen wird deutlich, daß eine erfolgreiche

quantitative Diagnose oft von der Rückgewinnung weniger Eier abhängt, die mit der Flotations-technik wegen der Verdünnung der Kotsuspension verlorengehen. In diesen Fällen arbeitet das Sedimentationsverfahren genauer. Gerade bei erwachsenen Rindern ist die Eiausscheidung ohnehin wegen ihrer natürlichen Resistenz gegenüber *F. hepatica*-Infektionen geringer (HAGENS, 1964; BORAY, 1969). Mit der Flotationsmethode waren bei 10 ep. nur 26,7 % der Kotproben positiv, durch die Sedimentation wurden dagegen in allen Proben Eier gefunden.

Auch mit der Methode nach DORSMAN (1956) sollen genauere Ergebnisse zu erwarten sein. Er entwickelte eine Siebtechnik, um *F. hepatica* Eier zu sammeln und in einer abgemessenen Wassermenge die Eizahl pro Gramm Kot zu bestimmen. Durch das erste Sieb mit einer Maschenweite von 150  $\mu$  werden grobe Kotpartikel zurückgehalten, während die Eier in einem zweiten Sieb (Maschenweite 50  $\mu$ ) aufgefangen werden.

KOOPMAN (1966) hält das Sedimentationsverfahren für sehr geeignet auch bei Rindern mit schwacher Eiausscheidung; es kann ebenso wie die Methode nach DORSMAN zur ep.-Bestimmung herangezogen werden, erscheint jedoch wesentlich zeitsparender.

GOTTSCHALK (1960) beschreibt ein Sedimentationsverfahren, wobei der Bodensatz durch ein feines Sieb in eine Petrischale gegeben und diese dann in Rotation versetzt wird; dadurch werden die Leberegeleier im Schalenzentrum konzentriert. Die

Methode ist rasch und sicher und erleichtert das sonst langwierige Durchmustern des gesamten Präparates.

RAMISZ und URBAN (1968) haben allerdings festgestellt, daß die Sicherheit der Sedimentationsmethode nur etwa 50 % beträgt. Bei 155 stark infizierten Schlachtrindern wurden vergleichende Untersuchungen auf Fasciola-Eier in Kot und Gallenblase unternommen. In nur zwei Gallenblasen wurden keine Eier gefunden, dagegen waren 53 Rinder koproskopisch negativ.

Trotzdem halten PARFITT und BANKS (1970) und RAYNAUD und Mitarb. (1974) das Sedimentationsverfahren noch für die geeignetste Methode. Schwierig wird der Nachweis bei allen Methoden jedoch, wenn Kotproben mäßig bis schwach infizierter Rinder zur Untersuchung gelangen. Bei einem natürlichen Eigehalt von unter 8 Eiern je 40 g Kot ist kein positives Ergebnis zu erwarten (SIX, 1968 a).

Um die Sicherheit des koproskopischen Nachweises zu erhöhen, soll der jahreszeitliche wie auch der tageszeitliche Entnahmezeitpunkt der Faecesproben von großer Wichtigkeit sein.

Im Winter und Frühjahr ist die Eiausscheidung am höchsten, da in diesen Jahreszeiten die Fasciolen sich in den Lebern zur vollen Geschlechtsreife entfaltet haben (DASKALOV, 1960; BOGATKO, 1972).

Arbeiten von HONER (1965 b), KECK und SUPPERER (1966) lassen erkennen, daß die Eiproduktion durch "progressive" Infektion, Leberregeneration und das Alter des Wirtstieres reduziert wird.

Nach DORSMAN (1967) ist die Eiausscheidung auch einem bestimmten Tagesrhythmus unterworfen. Die Eizahl pro Gramm Kot zeigt eine Fluktuation mit einem Maximum am Anfang des Nachmittages. Auch BOGATKO (1972) fand in Kotproben, die in dieser Zeit entnommen wurden, 2,5mal mehr Eier als in Morgenfaeces.

Trotz der Beachtung der genannten Kriterien und der Wahl eines geeigneten koproskopischen Nachweisverfahrens ist oft ein erheblicher Zeitaufwand erforderlich, um gerade im Masseneinsatz eine sichere und rasche Diagnose zu stellen. SIX (1968a) empfiehlt für Massenuntersuchungen ein modifiziertes Leitz-Trichinoskop. In schwach befallenen Rinderbeständen wird man selten mit der Untersuchung nur einer Faecesprobe auskommen. Wegen der geringen Eiausscheidung sind Kotentnahmen an mehreren, aufeinanderfolgenden Tagen notwendig, um die Diagnose zu sichern (HONER, 1965 a).

Die also oft schlechte Nachweisbarkeit der Rinderfasciolose mit Hilfe der koproskopischen Diagnostik hat viele Autoren angeregt, andere, vor allem serologische Verfahren zu erarbeiten, um ein sicheres Ergebnis zu erreichen.

## 2.2. Serologische und allergische Nachweisverfahren

Eine der ältesten in der Serodiagnostik angewandten Methoden ist die Komplementbindungsreaktion. Während bei der Fasciolose des Schafes teilweise noch brauchbare Ergebnisse zu verzeichnen sind, be-

trägt die Spezifität bei natürlich befallenen Rindern höchstens 67 %. Komplementbindende Antikörper sind beim Kaninchen bereits 10 - 17 Tage nach experimentellen Infektionen nachweisbar (DRAGNEVA, 1968).

BENEX und Mitarb. (1959) verwendeten als KBR-Antigen einen salinen Extrakt aus adulten *F. hepatica* und *Dicrocoelium*. Sie verwendeten Seren von nachweislich infizierten Schafen, die alle positiv reagierten. Die Autoren erhielten jedoch auch fälschlich positive Ergebnisse bei negativem Kotbefund.

MATHUR (1966) überprüfte die Zuverlässigkeit der KBR mit verschiedenen *Fasciola*-Antigenen. Beim Schaf waren die Resultate unbefriedigend. Wesentlich bessere Erfolge erzielte YAKHONTOV (1970). Mit *Fasciola* Polysaccharid Antigen reagierten 99 % der Seren natürlich infizierter Schafe positiv, jedoch auch 4,4 % der Seren leberegelfreier Tiere.

FRICK (1970) arbeitete mit Rinderseren und erreichte eine Effizienz von 66,7 % bei 17,8 % positiven Fehlreaktionen. Nach den Untersuchungsbefunden konnte kein Zusammenhang zwischen der Titerhöhe und dem tatsächlichen bei der Sektion ermittelten Befall festgestellt werden. KAPP-BURZYNSKA und Mitarb. (1974) erlangten mit der KBR nur eine Genauigkeit von 58,8 %. Die KBR erscheint ihnen für die Serodiagnostik der Rinderfasciolose unbrauchbar, bedingt auch durch die hohe Anzahl falsch positiver Titer von 28,9 %.

Die Untersuchungen von BLANCOU und Mitarb. (1971) bestätigen das. Nur 23 - 48 % der Seren von *F. gigantica* infizierten Zebus reagierten positiv.

Die Präzipitation, heute meist nur noch als Agar-gelpräzipitation im einfachen oder Doppeldiffusionstest angewandt, ist eine wenig arbeitsaufwendige, elegante Methode, die allerdings nur qualitative Aussagen zuläßt.

ICHIHARA und Mitarb. (1956) geben die Sicherheit dieses Verfahrens mit 90 % an und sind der Meinung, daß es für die *Fasciola*-Diagnostik bei Rindern und Ziegen benutzt werden kann.

Auch WIKERHAUSER und Mitarb. (1961) beschreiben eine ähnlich hohe Effektivität. Mit Hilfe des von ihnen entwickelten Mikro-~~P~~räzipitationstestes reagierten 95,6 % der Seren infizierter Rinder positiv bei allerdings 18 % positiver Fehlreaktionen. Die Intensität des Testes verlief nicht proportional der Schwere der Infektion.

Mit dieser Methode erzielten SPUHLER und Mitarb. (1958) eine Effizienz von 88 % bei stark infizierten Rindern. Die Sicherheit nahm jedoch bei geringem Befall merklich ab. Diese Mitteilung wird durch die Angaben von ATIENZA FERNANDEZ (1968) bestätigt. KOCH (1969) gelang erst nach einer Belastungsinfektion, mehr positive Tiere als bei der Erstinfection zu ermitteln.

FRICK (1968) gibt die Sicherheit des Testes bei chronisch infizierten Rindern gar nur mit 29,3 % an, in schwer befallenen Beständen zeigten 45,2 % der Seren eine Übereinstimmung mit den Schlachtbefunden. Zu ähnlich schlechten Ergebnissen, die die unzulängliche Diagnostik beweisen, kamen BLANCOU und Mitarb. (1971) und KAPP-BURZYNSKA und Mitarb. (1974).

Bei den Agglutinationsmethoden wird die Antigen-Antikörperreaktion durch korpuskuläres Antigen hervorgerufen. Gelöste Antigene werden dabei an entsprechende korpuskuläre Elemente, wie Erythrozyten oder Kunststoffpartikel, z. B. Latex oder Bentonit, gekoppelt.

Eine heute für die Leberegeldiagnostik nur selten angewandte Methode ist die Indirekte Hämagglutination. Die Antigene werden meist an tannierte Erythrozyten gekoppelt (STAVITSKY, 1964; HERBERT, 1973). Eine höhere Stabilität und Haltbarkeit erreicht die Erythrozytensuspension durch Glutaraldehydfixation (ALI-KHAN, 1974). Die Erfolgsberichte in der Literatur sind sehr unterschiedlich. In der Diagnostik menschlicher Fasciolose waren BIGUET, ROSE und CAPRON (1965) zu 100 % mit der von ihnen beschriebenen Methode erfolgreich. Sie erreichten Titer bis 1 : 16000. GOMEZ GARCIA (1968) untersuchte Seren Fasciola infizierter Schafe und erreichte einen Erfassungsgrad von 90 % mit somatischem und 97,6 % mit metabolischem Antigen. Zum Vergleich zeigte der Latextest nur eine Effizienz von 78,5 %.

BABENSKAS (1967) gibt die Sicherheit des Häm-agglutinationstestes bei Schaf und Rind mit 60 - 84 % an. Die Reaktion trat am deutlichsten zwischen dem 45. und 80. Tag p. i. auf.

Eine Abwandlung der Hämagglutination stellt die Flocculation dar. In diesem Verfahren werden die Erythrocyten durch Kunststoffpartikel ersetzt. Latexantigensuspensionen scheinen nach den Angaben in der Literatur eine gute Stabilität aufzuweisen (BENEX, 1964; GOMEZ GARCIA, 1968; ATIENZA FERNANDEZ, 1968). Die Sensibilität dieser Methode bei der Fasciolose der Wiederkäuer wird mit über 90 % angegeben. GLADYSZ-PAWLAK (1974) konnte nachweisen, daß bei Rindern mit massiven Infektionen und chronischen Leberläsionen die positiven Ergebnisse weit höher lagen als bei mäßig befallenen Tieren. Die Effizienz lag bei 80,5 %. Allerdings wurden auch 5,8 % falsch positive Reaktionen ermittelt.

Untersuchungen von FRICK (1968) an Färsen und Kühen haben ergeben, daß bei stark infizierten Tieren in Beständen mit einer koproskopisch nachgewiesenen Befallsextensität von 73,2 % der Latextest mit 88 % Erfassung die beste Übereinstimmung zeigte.

Frischer Leberegelbefall, der durch mäßige Veränderungen der Gallengänge angezeigt und vorwiegend bei Färsen anzutreffen war, wurde am sichersten durch den Latextest erfaßt. Positive Fehlreaktionen führte FRICK (1970) auf verschiedene Ursachen der

Antigenbeschaffenheit, der Latexzusammensetzung und auf eine unspezifische Erhöhung des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinspiegels bei infizierten Rindern zurück. Polyacrylsäureester als Dispersionsmittel zur Anlagerung des Antigens an Latex-Partikel erbrachte noch die besten Ergebnisse.

HÖRCHNER (1973) benutzte ein an Latex gekoppeltes Fasciola-Antigen, das für qualitative Untersuchungen als Schnelltest eine echte Praxis-methode darstellt. Er erzielte einen Erfassungs-grad von 75 %. Störend wirkten sich jedoch die häufigen positiven Fehlreaktionen aus. Von 56 Rindern, die einen negativen Galle- und Leberbefund zeigten, reagierten 21 Tiere serologisch positiv.

Die von COONS und Mitarb. (1942) eingeführte Immunfluoreszenz ist in den letzten Jahren zu einer Standardmethode in der Serologie geworden, die heute auch bereits bei einer Vielzahl von Parasitosen angewandt wird. SADUN (1963) führte den indirekten Fluoreszenztest in die Diagnostik von Helminthosen ein. Er verwendete Miracidien und Zerkarien von Schistosoma mansoni sowie Larven von Trichinellen und Filarien als Antigen, behandelte diese mit Seren von menschlichen Parasitenträgern sowie anschließend mit fluoreszeinkonjugierten Antihumanglobulinen. Im UV-Licht unter dem Mikroskop zeigten sämtliche der untersuchten Seren eine Fluoreszenz.

Zum Nachweis der Schistosomose des Menschen wird der Test mittlerweile standardmäßig benutzt (COOKSON, 1963; COOKSON und Mitarb., 1964; KAGAN und Mitarb., 1965; SADUN und GORE, 1967).

FRAGA de AZEVEDO und COELHO-ROMBERT (1965) prüften die indirekte Immunofluoreszenzmethode auf ihre Anwendbarkeit in der Fasciolosediagnostik bei Mensch und Schaf. Die Sensibilität lag bei 80 % bzw. 73,6 %. Als Antigen dienten Mirazidien.

COUDERT und Mitarb. (1967) verwendeten zum Nachweis der Fasciolose des Menschen Leberegelgefrierschnitte als Antigen, die wesentlich einfacher herzustellen sind als die Aufbereitung von Mirazidien und bringen auch sensitivere und spezifischere Reaktionen. THORPE (1965) demonstrierte die Antigenverteilung von *F. hepatica* mit Hilfe der direkten Fluoreszenz in verschiedenen Entwicklungsstadien. Am geeignetsten erschienen juvenile, 2 - 4 Wochen alte Egel, bei denen starke Randfluoreszenzen auftraten. In adulten Fasciolen waren sie weniger intensiv. Dagegen zeigten die inneren Organe eine starke Eigenfluoreszenz (MOVSESIJAN und Mitarb., 1967).

Über die Anwendung der Immunfluoreszenz beim Rind sind bisher nur wenige Arbeiten bekannt.

KOCH (1969) stellte Untersuchungen über die Brauchbarkeit von indirekter Hämagglutination, Flocculation, Gel-Präzipitation und der Immunfluoreszenz an experimentell mit *F. hepatica* infizierten Rindern an.

Von den vier Methoden war die Fluoreszenz das sicherste Verfahren. Bei der Verwendung von Adulten-Gefrierschnitten als Antigen stellte sich eine große Empfindlichkeit heraus. Die ersten Antikörper bei Kälbern traten bereits 2 Wochen p. i. auf, und 14 Tage später waren die Seren von 14 der 15 geprüften Tiere positiv.

Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Arbeit von PERSON (1974), der ebenfalls bei experimentell infizierten Rindern noch Antikörper bis zu 15 Wochen p. i. nachweisen konnte. Nach der Behandlung sanken die Titer ab, 3 Tiere jedoch reagierten noch 20 Wochen nach der Therapie.

Eine weitere immunologische Nachweismethode stellt die kutane Allergieprobe dar, die vor allem bei Feldversuchen leicht anzuwenden ist. Allergische Reaktionen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe von Reaktionen wird durch Antikörper ausgelöst, die häufig im Serum mit induzierter oder spontaner Allergie nachgewiesen werden können (Allergie vom Soforttyp). Bei der zweiten Gruppe von Reaktionen, den Allergien vom verzögerten oder Tuberkulintyp, konnte kein Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Serumantikörpern gefunden werden, vielmehr besteht eine enge Beziehung zu Zellen, die eine veränderte immunologische Reaktionsfähigkeit zeigen (sensibilisierte Zellen).

Bei allen bisher zum Nachweis der Fasciolose angewandten Kutanteste handelt es sich um eine Reaktion vom Soforttyp. Die Hautveränderungen treten meist innerhalb von 15 - 60 Minuten nach der Injektion des Antigens intrakutan auf und sind spätestens nach 24 Stunden abgeklungen.

DOYLE (1973 b) stellte fest, daß die allergischen Reaktionen durch den Intradermaltest bei Kälbern mit 4 - 12 Wochen alten Infektionen bereits nach 1 - 2 Stunden verschwanden. Bei Rindern jedoch, die vor 12 - 20 Wochen infiziert worden waren, blieben die Veränderungen für mehr als 6 Stunden bestehen, wahrscheinlich bedingt durch die vermehrte Bildung von präzipitierenden und homocytotropen Antikörpern.

VAREJCKO (1966) prüfte die Dauererhaltung der allergischen Reaktionsfähigkeit nach der wiederholten Therapie an Fasciola erkrankten Kühen. Der Versuch hat gezeigt, daß die Hypersensibilität bei 47 % der behandelten Rinder länger als 9 Monate erhalten blieb.

SOULSBY (1954) erreichte mit einem *F. hepatica*-Extrakt als Antigen an 164 leberegelinfizierten Rindern eine Erfassung von 90 %. Die auftretenden Hautreaktionen zeigten eine Stärke von 6 mm und mehr. Von 48 der getesteten Tiere, die nicht infiziert waren, traten bei 83 % Schwellungen unter 6 mm auf.

Noch bessere Ergebnisse erzielten PATNAIK und DAS (1961). Als Antigen verwendeten sie getrocknete Egel, die in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung in einer Verdünnung von 1 : 300 suspendiert wurden. Von 21 mit *F. gigante* befallenen Schlachtrindern, 20 Tiere waren koproskopisch positiv, reagierten alle im Kutantest.

Mit einem ähnlichen Antigen arbeiteten AEDOU und Mitarb. (1966). Der vordere Abschnitt der verwendeten Egel enthielt die höchste Antigenkonzentration. Von 98 Schafen, bei denen *F. hepatica*-Eier im Kot nachgewiesen wurden, reagierten 94 % positiv.

Auch in Untersuchungen von FAVATI und DELLA CROCE (1964) erbrachte der Intradermaltest bei leberegelbefallenen Rindern eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Schlachtbefund.

Weniger optimistisch beurteilt FRICK (1968) die Kutanprobe. In Untersuchungen an Schlachtrindern zeigte der Intradermaltest zu 65 % Leberegelbefall an und stimmte zu 67 % mit dem positiven Sekretionsbefund überein. Bei einer Inkongruenz von 45 % wurden jedoch weit mehr positive Fälle ermittelt, als sie dem tatsächlichen Befall entsprachen.

Ähnliche Befunde erhielten BLANCOU und Mitarb. (1971). Von 209 natürlich oder experimentell mit *F. gigantica* infizierten Zebus reagierten 60 - 70 % positiv, bei allerdings 30 - 35 % falsch positiven Resultaten.

Sicherlich sind die unterschiedlichen Reaktionen auch auf die Verwendung der verschiedenartig hergestellten Antigene zurückzuführen. WIKERHAUSER und BARTULIC (1961) prüften verschiedene *Fasciola*-Antigene an Schlachtrindern unterschiedlichen Alters und erreichten mit metabolischem Antigen eine Sensibilität von 79,5 %, mit somatischem Antigen 65 % und mit einer Polysaccharidfraktion 39 %.

Außerdem spielen andere Einflüsse, wie Alter der Tiere, gleichzeitige Invasionen mit anderen Parasitenarten, wahrscheinlich eine nicht unerhebliche Rolle für die Spezifität des Tests (HÖRCHNER, 1973).

Neben den direkten Kutanproben wird für den Nachweis homocytotroper Antikörper die PCA-Reaktion (passive cutane Anaphylaxie) verwandt.

DOYLE (1973 a) entnahm Kälbern monatlich nach der experimentellen Infektion mit *F. hepatica* Serumproben und injizierte diese Antikörper-haltigen Seren intrakutan anderen nicht infizierten Rindern in verschiedenen Verdünnungen. Jeweils nach 72 Stunden erhielten die Tiere einen lipidfreien *F. hepatica*-Extract (Antigen) intravenös.

Zur Verdeutlichung der Gefäßdurchlässigkeit, die an einem Erythem und einer Schwellung an der Injektionsstelle des Antikörpers zu erkennen war, wurde gleichzeitig mit dem Antigen eine 1%ige Lösung von "Evans-Blau" in den Kreislauf gebracht. Die Gefäßdurchlässigkeit wurde sichtbar durch einen blauen Fleck.

Die Untersuchungen zeigten, daß eine maximale Konzentration von homocytotropen Antikörpern in denjenigen Seren auftrat, die 20 - 28 Wochen p. i. gewonnen wurden.

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Material und Methodik

Für die vergleichenden Untersuchungen zur Überprüfung der verschiedenen Diagnosemöglichkeiten der Fasciolose wurden von insgesamt 504 Schlachtrindern aus dem Kreise Tecklenburg im Jahre 1974 jeweils Kot und Gallenblase entnommen, Blut für die serologischen Methoden gewonnen und die Lebern auf Veränderungen bzw. Leberegel überprüft.

Die Kotproben wurden nach dem im Institut angewandten und modifizierten Benedekschen Sedimentationsverfahren untersucht. Hierzu wurden ca. 3 - 5 Gramm Kot in einer Petrischale gut mit Wasser verrührt und durch ein planes Sieb mit einer Maschenweite von 250  $\mu$  in ein Becherglas (ca. 10 cm Standhöhe) gegeben und nach Zusatz weniger Tropfen "Tween" als Detergentienlösung mit Wasser aufgefüllt. Nach 3 - 4minütigem Absetzen, Dekantieren des Überstandes und Wiederauffüllen mit Wasser wurde der Vorgang 2 - 3mal wiederholt, um anschließend den Bodensatz unter Verwendung einiger Tropfen gesättigter wäßriger Methylenblaulösung mit Hilfe eines Leitz-Trichinoskopes auf Fasciola-Eier zu untersuchen.

Die Gallenflüssigkeit wurde ca. 1 : 10 mit Leitungswasser verdünnt und der Bodensatz wie bei der Kotuntersuchung nach dem Absetzen und mehrmaligem Auswaschen auf Fasciola-Eier durchgemustert.

Die Beurteilung der Lebern erfolgte nach der äußeren Adspektion, Palpation und den nach ABA §§ 21,22 des Fleischbeschaugesetzes vorgeschriebenen Schnitten. Nur bei sichtbaren Gallenveränderungen wurden die Organe zerlegt und auf Leberegel untersucht.

Bei Untersuchungen über die Eiausscheidungs-  
dauer bzw. des Antikörpertiters im Serum nach einer Leberegeltherapie wurden die Lebern von 47 infizierten Rindern in schlachtwarmem Zustand vollständig in 1 cm dünne Scheiben geschnitten und nach mehrstündiger Aufbewahrung in warmer physiologischer NaCl-Lösung und mehrmaligem Ausquetschen auf Egel untersucht.

Zur Gewinnung des Serums verblieben die entnommenen Blutproben mehrere Stunden bei Zimmertemperatur, wurden dann abzentrifugiert bei 3000 U/Min. (10 Min.) und bei  $-20^{\circ}$  C bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Als serologische Nachweisverfahren verwendete ich:

- a) den Fasciola-Latex-Schnellagglutinationstest der Behringwerke. Als Antigen kam eine Suspension von Latexpartikeln, die mit gereinigtem, fraktioniertem Homogenat von Fasciola hepatica beladen waren, zur Anwendung. Ein Tropfen des zu untersuchenden unverdünnten Serums und die gleiche Menge Antigen wurden auf einer schwarzen Platte mit einem Rührstäbchen gut vermischt. Die Reaktion konnte

nach 7minütigem Hin- und Herschwenken der Platte abgelesen werden. Später eintretende Agglutinationen wurden nicht mehr bewertet. Der Ausfall der Latex-Agglutinationen wurde makroskopisch beurteilt.

Bei einer kompletten Agglutination bildeten alle Latexpartikel Flocken am äußeren Rand des Tropfens, bei einer negativen Reaktion blieben die Partikel dagegen einheitlich milchig.

- b) Zur Durchführung der Agargelpräzipitation verwendete ich die Methode nach SCHEIDEGGER (1955). Die Herstellung des Fasciola-Rohantigens erfolgte nach der von DORN (1974) beschriebenen Methode. *F. hepatica* Exemplare aus Lebern frisch geschlachteter Rinder wurden zunächst mehrmals in Aqua dest. gewaschen, dann mit einer Schere zerkleinert und in einem eisgekühlten Glasrührer unter Zusatz von Coons-Puffer homogenisiert. Nach 12stündiger Extraktion im Kühlschrank wurde die Egel-suspension 20 Min. bei 10 000 g bei 4° C zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit anschließend 24 h gegen Puffer im Kühlschrank dialysiert. Die Eiweißbestimmung nach Biuret ergab 1,2g%. Auf die mit 2%igem Agar beschichteten und ausgestanzten Objektträger wurden Antigen und Seren aufgetragen und 24 h in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Für weitere 24 h wurden die Objektträger in Coons-Puffer gelegt und 24 h gewässert; an-

schließlich für 1 h in NaCl-freie Coons-Pufferlösung, Lufttrocknung, Anfärbung mit Amidoschwarz und dreimaliges Entfärben mit Spülflüssigkeit (100ml Eisessig, 450 ml Methanol, 450 ml Aqua dest.).

- c) Den indirekten Immunofluoreszenztest führte ich im wesentlichen nach der Methode von COUDERT und Mitarb. (1967) durch. Als Antigen verwendete ich Tiefgefrierschnitte von Egel aus Mäusen, die mit 10 - 15 Metazerkarien per os infiziert und nach 25 Tagen getötet worden waren. Die präadulten Egel wurden in Aqua dest. gewaschen und in Rattenleber gebettet. Die luftgetrockneten Schnitte wurden in Carnoy'scher Lösung 5' fixiert, in absolutem Alkohol gespült und danach bis zur Verwendung im Tiefkühlfach aufbewahrt.

Zur Durchführung des Testes wurden die Schnitte nach dem Auftauen mit Nagellack umrandet und die Rinderseren in Verdünnungen von 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 aufgetragen. Nach dem Inkubieren (30 Min. bei 40° C) in der feuchten Kammer wurden die Seren mit Coons-Puffer Ph 7,4 je zweimal 5 Min. abgespült und die Schnitte nach dem Trocknen mit Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertem Antiglobulin (Rabbit anti bovine, Nordic Immunological Laboratories, Tilborg, Niederlande) in der Verdünnung von 1 : 3 überschichtet und wieder für 30 Min. in der feuchten Kammer aufbe-

wahrt. Überschüssiges Konjugat wurde dreimal 5 Min. mit Coons-Puffer abgewaschen. Nach der 6minütigen Färbung mit Evan's Blue (1 : 10 000) und erneutem Waschen mit Puffer wurden die Schnitte mit einem Tropfen Glycerin-Carbonatpuffer (1 : 10) eingedeckelt.

Die Beurteilung erfolgte unter einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop im Auflicht. Benutzt wurden zwei Kurzpaßfilter (KP 500) und ein Breitpaßfilter (BP 490), sowie die Sperrfilterkombination 53/41.

Für die Kot- und Gallenuntersuchungen standen 504 Schlachtrinder zur Verfügung. Hierfür wurde das Tiermaterial in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste bestand aus 229 Bullen bis zu zwei Jahren, die andere aus 275 Färsen und Kühen über zwei Jahre. Zur Prüfung des serologischen Nachweises der Fasciolose wurden die Schlachttiere nach ihrem Leberbefund in drei Gruppen gegliedert. In der ersten Gruppe waren diejenigen Rinder zusammengefaßt, deren Lebern sichtbare Gewebs- und Gallengangsveränderungen mit lebenden Egel n aufwiesen. Die zweite Gruppe enthielt Tiere mit sichtbaren Gewebs- und Gallengangsveränderungen, jedoch ohne lebende Egel. In der dritten Gruppe waren Rinder aufgeführt, deren Lebern bei der Fleischschau nicht beanstandet wurden.

Die Gegenüberstellung der Leber-, Galle- und Kotbefunde mit Serumtitern erfolgte in der Fasciola-Latex-Agglutination bei allen 504 Rindern, während für den indirekten Immunofluoreszenztest sowie für die Agargelpräzipitation Serumproben von 284 Tieren herangezogen wurden.

Die Ausscheidungsdauer von Leberegeleiern aus den Lebern nachweislich infizierter Rinder nach einer Behandlung sowie die Verweildauer und die Ausscheidung der in der Gallenblase befindlichen Eier wurden an 47 Tieren geprüft.

Außerdem sollte nach der Deparasitierung der Titerabfall im indirekten Immunofluoreszenztest ermittelt werden.

Zunächst war es während des Untersuchungszeitraumes besonders schwierig, in den planmäßig behandelten Gebieten eine genügende Anzahl Fasciola-infizierter, lebender Tiere zu finden. Wegen des geforderten Schlachtermins 3 - 4 Monate nach der Behandlung konnten überwiegend nur Bullenbestände herangezogen werden. Insgesamt wurden 36 Bullen im Alter von zwei Jahren und 11 Kühe erfaßt, die vor der Behandlung mehrmals kontinuierlich Fasciola-Eier ausschieden und während der gesamten Untersuchungszeit in Stallhaltung verblieben. Von allen Tieren wurden nach der Therapie mit dem Präparat

Brotianide<sup>+) (Bay Va 4059, Dirian®) in der Dosierung von 10 mg/KGW einmal wöchentlich bis zum Schlachtermin Kot- und in vierzehntägigem Abstand Blutproben entnommen und untersucht.</sup>

<sup>+) 2-Acetoxy-3-brom-5-chlor-N-4'-bromphenyl-thiobenzamid</sup>

### 3.2. Ergebnisse

#### 3.2.1. Sicherheit der koproskopischen Diagnose bei der Fasciolose des Rindes und Eiausscheidung nach der Therapie.

Zur Klärung der Aussage-Effizienz einer einmaligen koproskopischen Untersuchung war insbesondere zu prüfen, welche Sicherheit in Abhängigkeit von der Befallsstärke diese Untersuchungsmethode bietet und wieviele Tiere und welche Rinderarten (Kühe, Färsen, Bullen) in die Untersuchungen einbezogen werden müssen.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen der Befunde von Kot, Gallenflüssigkeit und Leberadspektion zusammengefaßt.

In der ersten Gruppe von 229 Bullen wurden in 52 Fällen Leberveränderungen durch teils starken, teils schwachen Fasciolabefall festgestellt, jedoch 57 eipositive Gallen ermittelt, während durch die Kotuntersuchung nur 23 Leberegelträger (40 %) erfaßt wurden.

In der zweiten Gruppe von 275 Kühen und Färsen wurden 102 Lebern wegen Fascioloseveränderungen beanstandet, aber nur bei 98 Tieren Eier in der Gallenblase gefunden. Mit 44 Kotpositiven lag der Erfassungsgrad bei 45 %.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Ausscheidungsdauer von Fasciola-Eiern aus den Lebern nachweislich infizierter Rinder geprüft. Lediglich in den ersten 4 Wochen nach einer Behandlung mit Dirian konnten bei 14 der 47 befallenen Tiere Leberegeleier im Kot nach-

gewiesen werden, anschließend waren die Proben negativ. Bei der Schlachtung allerdings waren in 19 Fällen (40 %) in der Gallenblase noch Fasciola-Eier zu finden, selbst bei 10 Tieren, die erst 8 - 16 Wochen nach der Therapie verwertet wurden (Tab. 2). Bei keinem der Rinder konnten jedoch lebende Egel in den Lebern gefunden werden. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, waren die Leber- und Gallengangsveränderungen bei den geschlachteten Tieren nicht besonders stark; nur 6 Organe wurden wegen hochgradiger Gallengangsinkrustationen und zum Teil Abszeßbildungen beanstandet.

| Anzahl der Tiere               |     | Anzahl von Tieren                    |      |      |      |          |         |                                                              |  |
|--------------------------------|-----|--------------------------------------|------|------|------|----------|---------|--------------------------------------------------------------|--|
|                                |     | Eier von Fasciola hepatica<br>im Kot |      |      |      | in Galle |         | Leberveränderungen durch F. hepatica<br>bei der Fleischschau |  |
|                                |     | pos.                                 | neg. | pos. | neg. | stark    | schwach | o.B.                                                         |  |
| Bullen bis zu<br>2 Jahren      | 229 | 23                                   | 195* | 57   | 172  | 26       | 26      | 177                                                          |  |
| Färsen u. Kühe<br>über 2 Jahre | 275 | 44                                   | 223* | 98   | 177  | 51       | 51      | 173                                                          |  |
| Insgesamt                      | 504 | 67                                   | 418* | 155  | 349  | 77       | 77      | 350                                                          |  |

Tab. 1: Vergleichsuntersuchungen von Kot, Gallenflüssigkeit und Leberveränderungen auf Fasciola hepatica - Befall an 504 Schlachtrindern

\* Von 19 Tieren konnten keine Kotproben entnommen werden.

| Anzahl von Eiausscheidern<br>vor der Behandl. |    | Anzahl von Eiausscheidern<br>nach der Behandl.<br>in Wochen |   |   |   |   |    | Schlachtung<br>nach der Behandl.<br>in Wochen |  | Anzahl von Tieren bei der Schlachtung<br>Eiausscheidung von<br>F. hepatica-Eiern |          |  | Leberverände-<br>rungen |         |
|-----------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------|---|---|---|---|----|-----------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------|----------|--|-------------------------|---------|
|                                               |    | 1                                                           | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |                                               |  | im Kot                                                                           | in Galle |  | stark                   | schwach |
| Bullen                                        | 2  | 2                                                           | 0 | 0 | - | - | -  | 4                                             |  | 0                                                                                | 0        |  | 0                       | 0       |
|                                               | 16 | 0                                                           | 2 | 4 | 0 | - | -  | 6                                             |  | 0                                                                                | 7        |  | 0                       | 15      |
|                                               | 4  | 0                                                           | 1 | 0 | 0 | 0 | -  | 8                                             |  | 0                                                                                | 0        |  | 0                       | 1       |
|                                               | 14 | 0                                                           | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 8-10                                          |  | 0                                                                                | 9        |  | 3                       | 8       |
| Kühe                                          | 3  | 1                                                           | 2 | 0 | - | - | -  | 4                                             |  | 1                                                                                | 2        |  | 3                       | 0       |
|                                               | 8  | 0                                                           | 2 | 0 | 0 | 0 | 0  | 8-16                                          |  | 0                                                                                | 1        |  | 0                       | 6       |
| Gesamt                                        | 47 | 3                                                           | 7 | 4 | 0 | 0 | 0  |                                               |  | 1                                                                                | 19       |  | 6                       | 30      |

Tab. 2: Dauer der Eiausscheidung und Schlachtbefund von Fasciola hepatica-infizierten Rindern nach der Behandlung

### 3.2.2. Sicherheit der serologischen Diagnose bei der Fasciolose des Rindes und Serumtiterabfall nach der Therapie.

Zur Überprüfung der Effizienz der Fasciola-Latex-Schnellagglutination wurden die Leber-, Galle- und Kotbefunde der 504 Schlachtrinder mit den Serumuntersuchungen verglichen. Im einzelnen sind die Ergebnisse in Tabelle 3 aufgeführt.

In der ersten Gruppe sind 32 Tiere erfaßt, die Lebern mit Gewebs- und Gallengangsveränderungen und lebenden Egel aufwiesen. Bei allen Tieren wurden Fasciola-Eier in der Gallenblase gefunden, bei 16 konnten im Kot Eier nachgewiesen werden, und die Seren von 19 Rindern reagierten positiv.

Die zweite Gruppe enthielt 122 Tiere, die sichtbare Leberveränderungen aufwiesen, aber keine Egel ermittelt wurden. 54 galle- und 55 serumpositive Rinder wurden gefunden neben 17 Eiausscheidern im Kot. Allerdings stimmte wie auch in der dritten Gruppe (keine sichtbaren Leberveränderungen) häufig der positive serologische Test nicht mit dem Gallebefund überein.

Von 350 Rindern der dritten Gruppe waren 28 Tiere koproscopisch positiv, und 69 wiesen Fasciola-Eier in der Gallenflüssigkeit auf; die Anzahl von 108 positiven Serumagglutinationen und 26 fraglichen Reaktionen lag fast doppelt so hoch wie die der Gallepositiven.

| Leberbefund                                                      | Anzahl<br>Tiere | Anzahl der<br>in Galle | Anzahl der Eiausscheider<br>im Kot | Anzahl der Serumproben<br>positiv | Anzahl der Serumproben<br>fraglich |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Gewebs- und Gallengangs-<br>veränderungen<br>lebende Egel        | 32              | 32                     | 16                                 | 19                                | 1                                  |
| Gewebs- und Gallengangs-<br>veränderungen<br>keine lebenden Egel | 122             | 54                     | 17                                 | 55                                | 2                                  |
| keine Veränderungen<br>keine Egel                                | 350             | 69                     | 28                                 | 108                               | 26                                 |

Tab. 3: Vergleichende Untersuchungen an 504 Schlachtrindern auf *Fasciola hepatica*.  
Gegenüberstellung der Leber-, Galle- und Kotbefunde mit Serumproben im  
Fasciola - Latex - Schnellagglutinationstest.

Für die Untersuchungen zur Verwendbarkeit des Immuno-  
diffusionstestes sowie der indirekten Immunofluores-  
zenz wurden Serumproben und Schlachtbefunde von 284  
Rindern herangezogen.

Bei keinem der 284 geprüften Seren konnten in der  
Agargelpräzipitation mit dem verwendeten Fasciola-  
Antigen sichtbare oder anfärbbare Präzipitationsban-  
den ermittelt werden. Zur Kontrolle verwendete Seren  
von Fasciola-infizierten Schafen und Kaninchen zeig-  
ten stets deutliche Präzipitationslinien.

Der indirekte Immunofluoreszenztest wurde an 284  
Schlachtrindern durchgeführt. Die erste Gruppe ent-  
hielt 18 Tiere mit Leberveränderungen und nachweis-  
lich lebenden Egel. Bei allen Rindern wurden Fasciola-  
Eier in der Gallenblase diagnostiziert; aber nur 9 Ei-  
ausscheider wurden durch positive Kotbefunde ermit-  
telt. Im indirekten Immunofluoreszenztest reagierten  
alle 18 Serumproben positiv in einer Verdünnung von  
1 : 2; bei einem Titer von 1 : 8 waren 17 Proben posi-  
tiv (94 %) und bei 1 : 32 noch 11 (61 %).

In der zweiten Gruppe (Leberveränderungen, keine le-  
benden Egel) sind 62 Rinder untersucht worden, davon  
waren 28 Tiere gallepositiv und 12 koproskopisch po-  
sitiv. Bei 45 Seren (73 %) war eine deutliche Fluo-  
reszenz zu erkennen (Titer 1 : 2), die in der Ver-  
dünnungsstufe von 1 : 32 nur noch bei 13 Proben (21 %)  
sichtbar war. Von 28 Tieren mit Leberveränderungen  
und negativen Kot- und Gallebefunden waren 17 serolo-  
gisch positiv.

Unter den 204 Tieren der dritten Gruppe ohne Leberveränderungen und Egel waren noch 35 Gallepositive und 15 Kotpositive zu finden. Im Immunofluoreszenztest reagierten in dieser Gruppe 30 Seren positiv und 5 Seren fraglich. Geht man davon aus, daß von 204 Rindern nur 35 Tiere schwach befallen waren (= 100 %), so ergibt sich eine Effizienz von 86 % in der Titerstufe von 1 : 2. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Von allen 284 Schlachtrindern wurden 12 fälschlich positive Tiere ermittelt (4 %), die weder Leberveränderungen und Egel noch Eier in Kot und Gallenblase zeigten. Auf der anderen Seite verlief der Test bei drei gallepositiven Tieren negativ.

Zur Aufklärung dieser falschen Resultate wurden die Seren von 40 Jungrindern und Kühen untersucht, die alle koproskopisch negativ waren. Die Tiere stammten aus verschiedenen Berliner Instituten, waren dort geboren und hatten nachweislich keine Fasciola-Infektionsmöglichkeit. Nur eine einzige Probe wurde als zweifelhaft beurteilt, alle anderen reagierten negativ.

Der letzte Versuch sollte den Titerabfall nach der Behandlung in Seren F. hepatica befallener Rinder im Immunofluoreszenztest zeigen (Tab. 5). Hierfür standen 36 Bullen und 11 Kühe zur Verfügung. Die Schlacht- und Kotbefunde dieser Tiere sind bereits erläutert worden.

Bis zur zweiten Woche nach der Behandlung reagierten noch alle 47 Tiere positiv, teilweise bis zu einem Titer von 1 : 32.

Ein Titerabfall ist jedoch schon hier zu erkennen, der in den späteren Wochen noch deutlicher wird. 4 Wochen nach der Therapie waren noch 33 von 47 Seren positiv, wobei die höchste Titerstufe von 1 : 8 bei nur 3 Tieren vorlag; 14 Rinder waren bereits negativ. Nach 6 Wochen erhöhte sich diese Zahl auf 20 von 42 Tieren (2 Bullen und 3 Kühe waren geschlachtet worden). In der achten Woche waren von 26 Tieren 25 negativ und 1 Rind mit einem Titer von 1 : 2 positiv. In der zehnten Woche reagierte keines der untersuchten Rinder mehr.

| Leberbefund                                                      | Anzahl<br>Tiere | Anzahl der Eiausscheider |        | Anzahl der Serumproben |          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|--------|------------------------|----------|
|                                                                  |                 | in Galle                 | im Kot | positiv                | fraglich |
| Gewebs- und Gallengangs-<br>veränderungen<br>lebende Egel        | 18              | 18                       | 9      | 18                     | 0        |
| Gewebs- und Gallengangs-<br>veränderungen<br>keine lebenden Egel | 62              | 28                       | 12     | 45                     | 0        |
| keine Veränderungen<br>keine Egel                                | 204             | 35                       | 15     | 30                     | 5        |

Tab. 4: Vergleichende Untersuchungen an 284 Schlachtrindern auf *Fasciola hepatica*.  
Gegenüberstellung der Leber-, Galle- und Kotbefunde mit Serumtitern im  
indirekten Immunofluoreszenztest.

| Tierart    | Anzahl von Seren in Wochen nach der Behandlung |                    |                    |                    |                    |                     |
|------------|------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|            | 1Wo.<br>ges. pos.                              | 2 Wo.<br>ges. pos. | 4 Wo.<br>ges. pos. | 6 Wo.<br>ges. pos. | 8 Wo.<br>ges. pos. | 10 Wo.<br>ges. pos. |
| Bullen     | 36 36                                          | 36 36              | 36 26              | 34 19              | 18 0               | 14 0                |
| Kühe       | 11 11                                          | 11 11              | 11 7               | 8 3                | 8 1                | 8 0                 |
| Gesamtzahl | 47 47                                          | 47 47              | 47 33              | 42 22              | 26 1               | 22 0                |
| Titer      | 13                                             | 7                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                   |
| 1:32       | 16                                             | 19                 | 0                  | 0                  | 0                  | 0                   |
| 1:16       | 13                                             | 11                 | 3                  | 1                  | 0                  | 0                   |
| 1:8        | 5                                              | 9                  | 13                 | 10                 | 0                  | 0                   |
| 1:4        | 0                                              | 1                  | 17                 | 11                 | 1                  | 0                   |
| 1:2        | 0                                              | 0                  | 14                 | 20                 | 25                 | 22                  |
| neg.       |                                                |                    |                    |                    |                    |                     |

Tab. 5: Indirekter Immunofluoreszenztest an Seren *Fasciola hepatica* befallener Rinder nach der Behandlung

#### 4. Besprechung der Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse einer einmaligen koproskopischen Untersuchung der beiden Gruppen von 229 Bullen und 275 Kühen, so kann man davon ausgehen, daß auch bei schwach bis mittelstark befallenen Tieren der Erfassungsgrad von Leberegelträgern mit dem Sedimentationsverfahren bei 40 - 45 % liegt. Diese Ergebnisse werden von RAMISZ und URBAN (1968) und ZARACHO (1974) bestätigt. Nach SIX (1968a) sind bei etwa 8 Eiern je 40 g Kot 40 % positive Untersuchungsergebnisse zu erwarten; bei höherem Eidgehalt dagegen kann fast durchweg mit positiven Resultaten gerechnet werden.

In der Gruppe "Bullen" ist die Anzahl der gallopositiven Tiere größer als die mit Leberveränderungen und größtenteils auch lebenden Egel. Dies kann dadurch erklärt werden, daß bei schwachen Erstinfektionen anfänglich an der Leber kaum äußerlich sichtbare Veränderungen zu erkennen sind und somit vereinzelt auftretende Egel bei den fleischbeschaulich üblichen Schnitten übersehen werden können.

Die Gruppe mit 275 Kühen enthält einerseits Tiere mit chronischen Leberveränderungen und lebenden Parasiten, zum anderen Rinder, bei denen aufgrund einer Behandlung oder Selbstreinigung immer noch Eimaterial abgestoßen wird (KECK und SUPPERER, 1966).

Deshalb werden bei Felduntersuchungen mit der Sedimentationsmethode Fasciola-Eier auch bei solchen Tieren nachgewiesen, die keine lebenden Egel mehr beherbergen, lediglich noch Eimaterial ausscheiden.

So konnte ich zwar nur bei einem Drittel der ursprünglich Fasciola-infizierten Rinder bis zu 4 Wochen nach der Behandlung noch Leberegeleier im Kot finden, dagegen waren die Gallenblasenbefunde bei 40 % der Tiere noch 4 - 16 Wochen positiv.

Auch SIX (1968b) konnte noch 90 Tage nach der Behandlung Leberegeleier im Kot nachweisen.

Die Dauer der Eiausscheidung nach der Applikation eines wirksamen Fasciolicids hängt sicher ganz wesentlich von Stärke und Umfang der Leberveränderungen bzw. ihrer allmählichen Restitutio ab.

Die serologischen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Agargelpräzipitation zum Nachweis der Fasciolose des Rindes nicht einzusetzen ist. SPUHLER und Mitarb. (1958), ATIENZA FERNANDEZ (1968) und KOCH (1969) weisen darauf hin, daß die Sicherheit der Methode bei mäßigen Infektionen merklich abnimmt. Wegen der unzulänglichen und unsicheren Aussagekraft wird dieses Verfahren auch von anderen Autoren abgelehnt (FRICK, 1968; BLANCOU und Mitarb., 1971; KAPP-BURZYNSKA und Mitarb., 1974).

Mit der Fasciola-Latex-Schnellagglutination können 59 % von schwach bis mittelstark infizierten Leberegelträgern erfaßt werden, also nur 9 % mehr als mit

der koproskopischen Untersuchungsmethode. Auffällig dagegen ist, daß in der Gruppe von Rindern ohne sichtbare Leberveränderungen und Egel bei 69 gallepositiven Tieren fast doppelt so viele positive Agglutinationsergebnisse vorlagen.

Die zu hohe Anzahl falsch positiver und zusätzlich 7 % fraglicher Reaktionen bei einwandfrei nicht infizierten Tieren (Leber, Galle und Kot negativ) stellen den Einsatz der Methode für eine Diagnostik in Frage. Die Unzulänglichkeit der Methode wird noch deutlicher, was aus der Übersichtstabelle 3 nicht hervorgeht, daß in 69 galle- und kotpositiven Fällen die Agglutination 36mal versagte und 71 Galle-, Kotnegative serologisch positiv waren (20 %).

FRICK (1970) führt diese positiven Fehlreaktionen auf verschiedene Ursachen zurück; so spielen die Antigenbeschaffenheit, die Latexzusammensetzung und eine etwaige unspezifische Erhöhung des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinspiegels eine wichtige Rolle.

Nach FRICK (1968) und GLADYSZ-PAWLAK (1974) liegen bei Rindern mit massiven Infektionen die positiven Serum-Agglutinations-Ergebnisse weit höher; die Autoren erreichten einen Erfassungsgrad von 80 % und mehr.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß bei derartig befallenen Tieren die koproskopische Untersuchung ebenfalls eine Sicherheit von über 70 % bietet (FRICK, 1968; SIX, 1968 a).

Von den drei serologischen Nachweismethoden zeigte die Immunofluoreszenz mit einem Erfassungsgrad aller der 18 nachweislich infizierten Rinder die besten Ergebnisse. Meist wurden Titerstufen von 1 : 16 bis 1 : 32 erreicht. Die positiven Serumreaktionen bei Tieren mit Leberveränderungen, jedoch ohne Egel, lagen bei 73 %, während der Anteil der Gallepositiven nur 45 % betrug. Somit wird mit dem Immunofluoreszenztest noch eine größere Anzahl ehemaliger Leberegelträger erfaßt. Die Anzahl der falsch positiven (4 %) bzw. falsch negativen Reaktionen (1 %) war nur gering.

Setzt man die gallepositiven Tiere der 284 untersuchten Rinder als Leberegelträger, so wird mit dem Immunofluoreszenztest eine Effizienz von 87 % erreicht. Dieses Ergebnis findet seine Bestätigung in Arbeiten von SADUN (1963), FRAGA de AZEVEDO und COELHO-ROMBERT (1965) und KOCH (1969).

In Übereinstimmung mit PERSON (1974) sanken bei Rindern nach einer Behandlung gegen *F. hepatica* die Serumtiter merklich ab. Nach 4 Wochen reagierten nur Seren von 3 Tieren mit einem Titer von 1 : 8, und 14 Proben waren bereits negativ.

Bei der Verwendung von *Fasciola*-Gefrierschnitten als Antigen treten nicht selten Probleme in der Beurteilung durch gewisse Eigenfluoreszenzen vor allem der Eier auf. Sie können vermieden werden durch den Gebrauch von präadulten, 4 Wochen alten Leberegeln (THORPE, 1965).

STEFFEN (1968) empfiehlt die Absättigung des Konjugates mit Leberpulver für 1 Stunde bei Zimmertemperatur. Zum anderen können die Gefrierschnitte nach der Fixation für 5 Min. in einer Detergentien-Lösung gespült werden (KOCH, 1969).

Trotz eines Erfassungsgrades von 87 % und einer niedrigen Fehlerrate ist die Immunofluoreszenz für den Masseneinsatz bei der Fasciolose-Diagnostik des Rindes wegen der zu aufwendigen und kostspieligen Technik nicht geeignet. Außerdem werden mit dieser Methode weit mehr ehemals infizierte Tiere erfaßt als mit dem Sedimentationsverfahren. Zudem ist die koproskopische Untersuchung wesentlich billiger und erreicht bei Rindern mit niedriger Befallsintensität immerhin einen Erfassungsgrad von 40 - 50 %.

Für Bestandsuntersuchungen im Rahmen großflächiger Bekämpfung der Fasciolose ist deshalb aus allen Haltungsgruppen (Kühe, Rinder, Bullen) jeweils eine repräsentative Anzahl von Tieren zu untersuchen. Bei Kopfzahlen einer Haltungsgruppe unter 10 müssen alle Tiere koproskopisch erfaßt werden, bei höheren Tierzahlen sind jeweils 40 % zu untersuchen.

Somit ist die koproskopische Untersuchung mit einem geringen, aber dann positivem Erfassungsgrad bisher noch die geeignetste Nachweismethode in Beständen. Sie kann für Einzeltieruntersuchungen als nicht sicher angesehen und sollte durch die indirekte Immunofluoreszenz ergänzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Zur Prüfung der Effizienz einer einmaligen koproskopischen Untersuchung auf Fasciolabefall wurden die Befunde von Leber, Gallenflüssigkeit und Kotproben bei 504 Schlachtrindern verglichen. Der Erfassungsgrad von Leberegelträgern mit dem Sedimentationsverfahren lag bei 40 - 50 %.

Die Ausscheidungsdauer von Fasciolaeiern aus den Lebern infizierter Rinder nach einer Therapie wurde an 47 Tieren geprüft. Bei 30 % der Rinder wurden lediglich in den ersten 4 Wochen nach der Behandlung Leberegeleier im Kot nachgewiesen, dagegen wurden 40 % bei der Schlachtung nach 4 - 16 Wochen als gallepositiv ermittelt.

Von den serologischen Methoden ist die Agargelpräzipitation für die Fasciolosediagnostik des Rindes bei großflächigen Bekämpfungsmaßnahmen nicht anwendbar, da keines der 284 geprüften Seren - die Rinder waren teilweise nur gering befallen - positiv reagierte.

Die Fasciola-Latex-Schnellagglutination wurde an 504 Schlachtrindern geprüft. Von 32 nachweislich infizierten Rindern reagierten 59 % positiv. Diese Methode lag damit in ihrer Aussagekraft nur um 9 % höher als die Kotuntersuchung. Die Anzahl der falsch positiven Agglutinationen betrug über 20 %; in 69 galle- und kotpositiven Fällen versagte der Test 36mal.

Die indirekte Immunofluoreszenz wurde bei 284 Rindern angewandt und erwies sich mit einer Erfassung von 87 %

aller galle-positiven Tiere als die sicherste Methode. Die Rate der falsch positiven Fluoreszenzen lag bei nur 4 %.

Bei Seren von 47 mit Dirian behandelten Rindern war bereits nach 4 Wochen im Fluoreszenztest ein deutlicher Titerabfall zu erkennen. Nach 8 Wochen war nur noch ein einziges Tier positiv.

### Summary

The results of liver, bile and faeces-samples of 504 slaughter cattle were compared in order to evaluate the efficiency of a one-time faecal examination. Using the sedimentation test, 40 - 50 % of all fasciola infested animals can be covered.

In a further investigation it was tested in 47 infested cattle how long the eggs of fasciola were shed from the livers after induced therapy. In 30 % of these animals fluke eggs were encountered in the faeces during the first 4 weeks after therapy. However, 40 % of these animals were positive in the bile after 4 - 16 weeks when slaughtered.

Of all tested serological methods the agar gel precipitation appears not at all feasible for the diagnosis of cattle fascioliasis in large field control campaigns because none of the 284 tested sera reacted positive (most of the animals showed only a low degree of infestation).

The fasciola-latex-fast-agglutination was tested in 504 slaughter cattle. Of the 32 confirmed infested animals, 59 % reacted positive. This method appears to be by 9 % superior to the faecal examination test. The number of false positive agglutinations was more than 20 %. Of the 69 cases positive in bile and faeces, the test failed in 36 cases.

The indirect immunofluorescence test was used in 284 cattle and proved to be the best method covering 87 % of all bile-positive animals. The rate of false positive results was only 4 %.

A significant decrease in anti-body titers in the IFT. was encountered already after 4 weeks in sera from 47 cattle treated with "Dirian". After 8 weeks there was only a single animal positive.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdou, A.H., A.El-Sherif, A.F.El-Sawi (1966): Intradermal diagnosis of fasciola infection.  
J.Arab.vet.med.Ass.26, 255 - 260,  
Ref.i.Vet.Bull.,Weybridge 38, 462, 1968
2. Ali-Khan,Z.(1974):Glutaraldehyde fixed-antigen sensitized stable cells in indirect hemagglutination test for rapid diagnosis of Hydatid disease, Trichinosis and Amoebiasis.  
Int.J.Parasit.4, 549-554
3. Atienza Fernandez,M.(1968):Empleo de particulas inertes para el diagnostic de la Distomatosis hepatica I. Prueba de la bentonita. II.Prueba de immuno-precipitacion con discos de papel impregnados de antígeno.  
Revta ibér.Parasit.28, 479-533
4. Babenskas,M.(1967):Diagnostic immunobiologique de la fasciolose des bêtes.XVIIIe Congr.Mond.Vet.,Paris 17-22 VII,I,131-134
5. Bénex,J.(1964):Le diagnostic sérologique pratique de la Distomatose.<sup>1</sup> Une méthode d'agglutination sur lame à l'aide d'antigène absorbé sur des particules de latex.  
Bull.Soc.Path.exot.57, 495-502
6. Bénex,J.,L.Lamy,J.Gledel (1959):Etude de la réaction de fixation du complément à l'antigène distomien chez le mouton.  
Bull.Soc.Path.exot.52, 83-87
7. Bénex,J.,J.Guilhon,R.Barnabé (1973):Etude comparative de diverse méthodes de diagnostic immunologique de la fasciolose hépato-biliaire expérimentale du mouton et influence du traitement sur la persistance des anticorps.  
Bull.Soc.Path.exot.66, 116-128
8. Biguet,J.,G.Rosé,A.Capron (1965):Le diagnostic de la Distomatose à Fasciola hepatica par la réaction d'hémagglutination.Comparaison avec les résultats de l'immunoélectrophorèse et de la réaction d'hémolyse.  
Bull.Soc.Path.exot.58, 866-878
9. Blancou,J.,A.Bouchet,P.Daynes (1971):Etude sur l'allergie, les anticorps précipitants et les anticorps fixant le complément au cours de l'infestation des bovins par Fasciola gigantica.  
Rev.Elev.Méd.vét.Pays trop.24, 373-379
10. Boğatko,W.(1972):Coproscopic diagnosis of Liver fluke in cattle (in Polnisch).  
Medycyna wet.28, 31-33

11. Boray, J.C. (1969): Experimental fascioliasis in Australia.  
Adv. Parasit. 7, 95-210
12. Boray, J.C., J.G. Pearson (1960): The anthelmintic efficiency of tetrachlorodifluoroethane in sheep infected with *Fasciola hepatica*.  
Aust. Vet. J. 36, 331-337
13. Breza, M. (1968): Zur Problematik der gleichzeitigen ovoskopischen Diagnose von Fasciolose und Dicrocoeliose bei Wiederkäuern.  
Wiad. parazyt. 14, 715-719
14. Cookson, L.O.C. (1963): Some investigations with the fluorescent antibody technique. I. Schistosomiasis II. Preliminary investigations.  
Cent. Afr. J. Med. 9, 429-434
15. Cookson, L.O.C., V. de V. Clarke, E. Pirie (1964): \_\_\_\_\_. III. The threshold fluorescent antibody test in schistosomiasis.  
Cent. Afr. J. Med. 10, 12-16
16. Coons, A.H., J. Creech, R.N. Jones, E. Berliner (1942): The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.  
J. Immun. 45, 159-170
17. Coudert, J., J.P. Garin, P. Ambroise-Thomas, Kien Truong Thai, J. Despeignes, M.A. Pothier (1967): La réaction d'immunofluorescence sur coupes de *Fasciola hepatica*: Une nouvelle technique pour le séro-diagnostic de la Distomatose.  
Bull. Soc. Path. exot. 60, 71-79
18. Daskalov, P. (1960): Eiagehalt und Eiproduktion von *Fasciola hepatica* Linné, 1758 (in Bulgarisch).  
Bull. Lab. cent. Helmint., Béogr. 5, 33-44
19. Dorn, R. (1974): Kreuzimmunisierungsversuche mit *Fasciola hepatica* (Linné, 1758) bzw. *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855) an Meerschweinchen.  
Vet. med. Diss. FU Berlin
20. Dorsman, W. (1956): A new technique for counting eggs of *Fasciola hepatica* in cattle faeces.  
J. Helminth. 30, 165-172
21. Dorsman, W. (1967): Further investigations into the fluctuation in number of *Fasciola hepatica* eggs in cattle faeces.  
Tijdschr. Diergeneesk. 92, 137-157
22. Doyle, J.J. (1973 a): Homocytotropic antibodies induced in calves by infection with *Fasciola hepatica*.  
Int. Archs Allergy appl. Immun. 45, 744-751
23. Doyle, J.J. (1973 b): Skin hypersensitivity reactions induced in calves by experimental infections with *Fasciola hepatica*.  
Int. Archs Allergy appl. Immun. 45, 752-758
24. Dragneva, N. (1968): Serological investigations in experimental fasciolosis (in Bulgarisch).  
Bull. Lab. cent. Helmint., Béogr. 12, 87-96
25. Favati, V., G. Della Croce (1964): Sulla diagnosi in vivo di distomatosi epatica nel bovino.  
Annali Fac. Med. vet. Univ. Pisa 17, 75-86

26. Fraga de Azevedo, F. Coelho-Rombert (1965):  
L'application de l'immunofluorescence  
au diagnostic de la Fasciolose hépatique.  
Annls Parasit.hum.comp. 40, 529-542
27. Frick, W. (1968): Zum immunobiologischen Nachweis der Rinderfasciolose.  
Arch.exp.VetMed. 22, 1011-1018
28. Frick, W. (1970): Nachweis der Rinderfasciolose und -dictyocaulose mit Hilfe des Latextests und der Komplementbindungsreaktion.  
Arch.exp.VetMed. 24, 1113-1122
29. Gladysz-Pawlak, K. (1974): The usefulness of chosen serological tests in the diagnosis of fascioliasis. IV. Comparison of the value of a latex test with an agar gel precipitation test (in Polish).  
Medycyna wet., 30, 229-231
30. Gomez Garcia, V. (1968): Serologia de la Distomatosis hepatica.  
Revta ibér.Parasit. 28, 423-454
31. Gottschalk, C. (1960): Zur Feststellung der Eier des Großen Leberegels (*Fasciola hepatica* L.) und einiger anderer Parasiten in Haustierkotproben.  
Mh.VetMed. 15, 89-91
32. Hagens, F.M. (1964): Laboratoriumdiagnose van leverbotinfecties.  
Tijdschr.Diergeneesk. 89, 437-442
33. Happich, F.A., J.C. Boray (1969): Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. I. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep.  
Aust.vet.J. 45, 326-328
34. Herbert, W.J. (1973): Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique.  
In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 20.6-20.16
35. Hörchner, F. (1973): Bietet die Serodiagnose eine Möglichkeit zur Überwachung und Effizienzkontrolle bei der großräumigen Bekämpfung der Fasciolose?  
In: Fasciolose-Symposium, 1973 in Tecklenburg, AID Bonn-Bad Godesberg
36. Honer, M.R. (1965 a): The interpretation of faecal egg-counts. I. Daily variations in *Fasciola hepatica* egg-counts in cattle.  
Z.ParasitKde. 26, 143-155
37. Honer, M.R. (1965 b): \_\_\_\_\_. II. Single and multiple sampling in the diagnosis of sub-clinical fascioliasis hepatica.  
Z.ParasitKde. 26, 156-162
38. Ichihara, T., S. Susumi, T. Kuramoto (1956): Studies on the diagnosis of fascioliasis. II. The precipitation test for fascioliasis in cattle. III. The precipitation test for fascioliasis in goat.  
Jap.J.vet.Sci. 18, 130-140

39. Kagan, J.G., A.J. Sulzer, K. Carver (1965): An evaluation of the fluorescent antibody test for the diagnosis of schistosomiasis.  
Am. J. Epidem. 81, 63-70
40. Kapp-Burzyńska, Z., E. Nolewajka, K. Pawlak, K. Szaflarski, J. Trzeciak (1974): The usefulness of chosen serological tests in the diagnosis of fascioliasis in cattle. III. Comparison of the value of CF test with agar gel precipitation test and iodine test (in Polish).  
Medycyna wet. 30, 34-36
41. Keck, G., R. Supperer (1966): Untersuchungen über den Großen Leberegel. II. Der Infektionsablauf in der Rinderleber.  
Wien. tierärztl. Mschr. 53, 328-331
42. Koch, H.-W. (1969): Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Haemagglutination, Flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation und der Immunofluoreszenz zum frühzeitigen Nachweis der Fasciolose des Rindes.  
Vet. med. Diss., FU Berlin
43. Koopman, J.J. (1966): Een vergelijkend onderzoek betreffende het faecesonderzoek op leverbosteieren.  
Tijdschr. Diergeneesk. 91, 1341-1348
44. Mathur, P.B. (1966): Versuche zur Feststellung der Brauchbarkeit der KBR für die Fasciola-hepatica-Diagnose.  
Vet. med. Diss., FU Berlin
45. Movsesijan, M., A. Sokolic, S. Sibalic (1967): Diagnosis of Fasciola hepatica infection by fluorescein-labelled antibodies.  
Acta vet., Béogr. 17, 409-413
46. Parfitt, J.W., A.W. Banks (1970): A method for counting eggs in cattle faeces in the field.  
Vet. Rec. 87, 180-182
47. Patnaik, B., K.M. Das (1961): Diagnosis of fascioliasis in cattle by intradermal allergic test.  
Cornell. Vet. 51, 113-123
48. Person, J.-M. (1974): Immunological diagnosis of bovine fascioliasis. Use of the indirect immunofluorescence method. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire, Alfort 143 pp.  
Ref. i.: Vet. Bull. Weybridge 45, 258, 1975
49. Ramisz, A., E. Urban (1968): The effectiveness of the sedimentation method in diagnosis of Fasciola hepatica in cattle.  
Wiad. parazyt. 14, 713-714
50. Raynaud, J.-P., E. Lafay, F. Leimbacher, G. Brunault, J.A. Nicolas (1974): Détection et numération des oeufs de Fasciola chez les ruminants.  
Comparaison de deux techniques spécifiques (Happich-Boray, 1969) (Gregoire et coll., 1956) et d'une technique multivalente (Raynaud, 1970).  
Revue Méd. vét. 125, 847-878

51. Sadun, E.H. (1963): Seminar on immunity to parasitic helminths. VII. Fluorescent antibody technique for helminth infections.  
Expl Parasit. 13, 72-82
52. Sadun, E.H., R.W. Gore (1967): Relative sensitivity and specificity of soluble antigens (metabolic and somatic) and whole cercariae in fluorescent antibody tests for schistosomiasis in humans and rabbits.  
Expl Parasit. 20, 131-137
53. Scheidegger, J.J. (1955): Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.  
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 7, 103-110
54. Sewell, M.M.H. and J.A. Hammond (1972): The detection of Fasciola eggs in faeces.  
Vet. Rec. 90, 510-511
55. Six, F. (1968a): Zur Diagnose des Leberegels Fasciola hepatica L.  
Tierärztl. Umsch. 23, 412-418
56. Six, F. (1968b): Zur Bedeutung der Gallenblase des Rindes als Ausscheidungsreservoir nach einer Leberegelbehandlung.  
Tierärztl. Umsch. 23, 418-424
57. Soulsby, E.J.L. (1954): Skin hypersensitivity in cattle infested with Fasciola hepatica.  
J. comp. Path. 64, 267-274
58. Spuhler, V., G.A. Moosbrugger, K. Meyer (1958): Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegeln behafteten Rinder.  
Schweizer Arch. Tierheilk. 100, 610-615
59. Stavitsky, A.B. (1964): Haemagglutination and haemagglutinationinhibition reactions with tannic acid- and bis-diazotized benzidine-protein-conjugated erythrocytes.  
In: Ackroyd, J.F., Immunological Methods, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 363-386
60. Steffen, C. (1968): Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 629-633
61. Teuscher, E. (1957): Eine neue praktische Flotationsmethode für den koprologischen Nachweis der Leberegeleier.  
Schweizer Arch. Tierheilk. 99, 523-528
62. Thorpe, E. (1965): An immunocytochemical study with Fasciola hepatica.  
Parasitology 55, 209-214
63. Vařejčko, J. (1966): Persistence of allergy in fasciolious cattle after treatment.  
Sb. vys. Sk. zeměd Brno 14, 137-141
64. Whitlock, H.V. (1950): A technique for counting trematode eggs in sheep faeces.  
J. Helminth. 24, 47-52

65. Wikerhauser, T., V. Bartulić (1961): Immunobiological diagnosis of fascioliasis. I. On the value of the somatic coca's extract, the polysaccharide fraction and the metabolic products of *F. hepatica* as antigens in the skin test on cattle (in Jugoslawisch). *Vet. Arh.* 31, 1-7
66. Wikerhauser, T., V. Bartulić u. J. Brglez (1961): Immunological diagnosis of fascioliasis. III. Further investigations of the value of the microprecipitation test in cattle (in Jugoslawisch). *Vet. Arh.* 31, 263-264
67. Yakhontov, B. V. (1970): Diagnosis of fascioliasis by the complement fixation reaction. In: Sultanov, M. A., Gan, E. I. (Editors), *Parazity zhivotnykh Uzbekistana (prosteishie, gel'minty, dvukrylye)*. Tashkent, USSR: Izdatel'stvo "FAN" *Uzbekskoĭ SSR.*, 133-139 (Ru)  
Ref. i. *Helminth. Abstr. A* 42, 376, 1973
68. Zaracho, Z. A. (1974): The diagnosis of liver fluke disease (*F. hepatica*) in cattle with a "KR" chamber. *Revta Med. vet., B. Aires* 55, 45-46, 49-50.  
Ref. i. *Helminth. Abstr. A* 44, 236, 1975

Herrn Professor Dr. F. Hörchner danke ich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung.

Ich danke auch allen Angehörigen des Instituts, die mir bei der technischen Ausführung der Arbeit behilflich waren.

Mein Dank gilt ferner dem Veterinäramt des Kreises Steinfurt, insbesondere Herrn Dr. F.-G. Flaßhoff, der durch seinen persönlichen Einsatz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Nicht zuletzt sei darauf hingewiesen, daß die Untersuchungen durch Förderung des Landes Nordrhein-Westfalen ermöglicht worden sind.



## Lebenslauf

Name: Hans Grelck  
Geburtsdatum: 24. 5. 1946  
Geburtsort: Barmstedt, Kreis Pinneberg  
Vater: Hans Heinrich Grelck, Landwirt  
Mutter: Martha Grelck, geb. Hoyer  
1953 - 1957: Besuch der Volksschule in Barmstedt  
1957 - 1966: Besuch der Bismarckschule Elmshorn,  
Neusprachl. Gymnasium für Jungen  
1966 Reifeprüfung  
1966 - 1967: Ableistung der Wehrpflicht  
1967 - 1972: Studium der Veterinärmedizin an der  
Tierärztlichen Hochschule Hannover  
19.10.1973 Approbation als Tierarzt  
1973 - 1974: Assistent in der Großtierpraxis  
seit 1.8.1974: Wissenschaftlicher Assistent am Insti-  
tut für Parasitologie und Tropenvete-  
rinärmedizin der FU Berlin.





